

Área: Engenharia de Alimentos

PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA *Spirulina* LEB-18 CULTIVADA EM EFLUENTE DA PRODUÇÃO DE BIOGÁS

Lucia Helena Rivero Meza, Adriano Arruda Henrard, Gabriel Martins, Joice Aline Borges, Caroline Borges Viana, Michele da Rosa Andrade, Jorge Alberto Vieira Costa*

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande

*E-mail: jorgealbertovc@terra.com.br

RESUMO

As microalgas se destacam por apresentar diversas potencialidades, como alimentos, fármacos e química fina. Os lipídios nos sistemas biológicos funcionam como componentes de membrana, produtos de reserva e como fonte de energia sendo que, parte dos lipídios é constituída de ácidos graxos. O objetivo deste trabalho foi verificar o conteúdo lipídico e o perfil dos ácidos graxos da microalga *Spirulina* LEB-18 cultivada em efluente da produção de biogás. A microalga foi cultivada em fotobiorreatores tipo raceway de 6 L, sob condições ambientais naturais, não controladas. Os cultivos foram realizados em modo semicontínuo, com concentração inicial 0,12 g.L⁻¹, até atingir 1,0 g.L⁻¹ (concentração de corte). Após atingir esta concentração, foi realizada a remoção e renovação de 50 % de meio de cultivo. Os ensaios foram realizados com meio Zarrouk padrão, e substituição de 20 % (v/v) de meio Zarrouk por efluente da produção de biogás (EPB), com adição de 2,8 g.L⁻¹ e 5,28 g.L⁻¹ de NaHCO₃. Os lipídios foram extraídos de acordo com o método de Folch & Lees e a esterificação foi realizada segundo o método descrito por Metcalfe et al.. A maior concentração lipídica (5,0 %), conteúdo em ácidos graxos saturados (38,48 %) e polinsaturados (14,24 %) foram obtidas quando a microalga foi cultivada com meio Zarrouk e 20 % de EPB com adição de 5,28 g.L⁻¹ de NaHCO₃. O cultivo de *Spirulina* LEB-18 com adição de EPB apresentou biomassa rica em ácidos graxos potencialmente empregáveis na alimentação e na produção de biocombustíveis.

Palavras-chave: ácidos graxos, biometano, microalga, lipídios.

1 INTRODUÇÃO

Nos sistemas biológicos, os lipídios funcionam como componentes de membrana, produtos de reserva, metabólitos e como fonte de energia sendo que grande parte dos lipídios

é constituída de ácidos graxos. Os triacilgliceróis (TAG) podem ser considerados a principal fonte energética da maioria dos organismos (Lehninger, 2004).

Muitas microalgas são utilizadas para produção de alimentos devido a estas produzirem diversas substâncias como vitaminas, sais minerais, pigmentos, lipídios e ácidos graxos (Macedo & Alegre, 2001). Dependendo da espécie, as microalgas produzem diferentes tipos de lipídios, hidrocarbonetos e outros óleos complexos (Banerjee et al., 2002, Metzger e Largeau, 2005 e Guschina e Harwood, 2006). O conteúdo e a composição dos lipídios e ácidos graxos em microalgas pode ser influenciado por fatores como luz (Fernández et al., 2000), temperatura e concentração da fonte de nitrogênio (Colla et al., 2004) e concentração de dióxido de carbono (Araújo & Garcia, 2005).

A composição da biomassa das microalgas é influenciada pelas condições físico-químicas do meio de cultivo e do ambiente em que são cultivadas, assim podem ter sua composição manipulada de modo a produzir compostos de interesse, de acordo com o uso pretendido. Os lipídios são alguns dos principais componentes presentes nas microalgas. Os ácidos graxos, quando extraídos, podem ser utilizados como alimento, fármacos ou transformados em biocombustíveis (Radmann & Costa, 2008).

O crescimento de algas e microalgas em efluentes da digestão anaeróbia é relatado em diversas condições. Esses organismos crescem indesejavelmente em águas naturais eutrofizadas que recebem efluentes do tratamento anaeróbio de resíduos. A utilização do efluente para a produção de biomassa, além de reduzir custos com nutrientes, contempla o aspecto econômico e ambiental, uma vez que o efluente não pode ser descartado sem tratamento no ambiente, onde poderia causar o fenômeno de eutrofização (Olguín et al., 2003) e seu tratamento para descarte adicionaria custos ao processo.

O objetivo deste trabalho foi determinar o conteúdo lipídico e o perfil de ácidos graxos da microalga *Spirulina* LEB-18 cultivada em efluente da produção de biogás.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

A microalga utilizada no estudo foi *Spirulina* LEB-18. Para manutenção do inóculo foi utilizado meio Zarrouk (Zarrouk, 1966). Para os ensaios foram utilizados 2 inóculos. Um dos inóculos foi mantido em meio Zarrouk padrão e o outro foi adaptado com EPB, onde foi feita a substituição de meio Zarrouk por efluente, com concentração de EPB de 20 % (v/v), durante 30 dias.

A microalga foi cultivada em fotobiorreatores tipo raceway de 6 L, com volume útil de 5 L, sob condições ambientais, naturais e não controladas, em estufa coberta de filme transparente. Os cultivos foram realizados em modo semicontínuo, com concentração inicial de biomassa 0,12 g.L⁻¹, até atingir 1,0 g.L⁻¹. Após atingir a concentração de corte, foi realizada a retirada de 50 % de meio de cultivo, e adicionada a mesma quantidade de meio novo (taxa de renovação). Os ensaios foram realizados com meio Zarrouk padrão, e substituição de 20 % (v/v) de meio Zarrouk por efluente da produção de biogás (EPB), com adição de 2,8 g.L⁻¹ e 5,28 g.L⁻¹ de NaHCO₃.

Após a coleta, a biomassa foi centrifugada, seca a 40 °C e moída. Os lipídios foram extraídos de acordo com o método de Folch & Lees (1957), utilizando clorofórmio:metanol (2:1) e determinados por gravimetria. Após a determinação da porcentagem de lipídios, as amostras foram esterificadas. A etapa de esterificação foi realizada utilizando trifluoreto de boro 1:10 como derivatizante, segundo o método descrito por Metcalfe et al., (1966). A coluna utilizada foi de 30 x 0,32 mm com filme de 0,25 micrômetros de espessura de DB-WAX (polietileno glicol). O padrão utilizado para comparação do tempo de retenção foi da Sigma contendo 37 ácidos graxos metil ésteres. A confirmação foi realizada através do diagrama de Ackerman.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta as concentrações de ácidos graxos para os ensaios realizados com a microalga *Spirulina* LEB-18.

Tabela 1: Perfil de ácidos graxos (%) da microalga *Spirulina* LEB-18 cultivada em meio Zarrouk padrão (E1), 20% EPB com adição de 2,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃ (E2) e 20% EPB com adição de 5,28 g.L⁻¹ de NaHCO₃ (E3).

| | E1 | E2 | E3 |
|-------------------------------|-------|-------|-------|
| Ácidos graxos saturados | | | |
| C 10:0 | 2,9 | 1,72 | 5,32 |
| C 12:0 | 0,43 | 0,28 | Nd |
| C 13:0 | nd | 0,73 | Nd |
| C 14:0 | 1,27 | 1,48 | Nd |
| C 15:0 | 0,33 | 0,55 | Nd |
| C 16:0 | 37,77 | 36,70 | 38,48 |
| C 20:0 | 1,28 | 0,50 | Nd |
| Ácidos graxos monoinsaturados | | | |
| C 14:1 | nd | 0,22 | Nd |
| C 15:1 | 1,86 | 1,69 | Nd |
| C 16:1 | 9,80 | 9,33 | 7,73 |
| C 18:1n9c | 1,01 | 1,90 | 3,36 |
| C 18:1n9t | 1,74 | 2,66 | 4,93 |
| Ácidos graxos polinsaturados | | | |
| C 18:2n6c | 10,83 | 12,94 | 14,24 |
| C 18:2n6t | 7,24 | 12,10 | 12,88 |
| C 18:3n6 | 6,00 | 5,76 | 5,34 |
| C 18:3n3 | 11,97 | 7,53 | 5,78 |
| C 20:2 | 1,77 | 0,60 | Nd |
| C 20:3n6 | 0,86 | 0,61 | Nd |
| C 20:3n3 | 1,25 | 0,93 | Nd |
| C 20:4n6 | nd | 0,29 | Nd |
| C 22:2 | 1,67 | 1,47 | 1,93 |
| Total | 100 | 100 | 100 |
| Fração lipídica | 5,00 | 4,90 | 5,00 |

nd: não detectado

A *Spirulina* LEB-18., quando cultivada com meio Zarrouk padrão e com 20 % EPB com adição de 5,28 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio, apresentou a mesmo conteúdo lipídico, sendo a máxima concentração de lipídios 5,0 %.

Dentre todos os ácidos graxos, o ácido palmítico (C16:0) foi o mais abundante, apresentando a maior concentração em todos os ensaios, variando de 36,70 a 38,48 %. Esses resultados foram compatíveis aos encontrados em trabalhos anteriores, onde o ácido palmítico foi determinado como predominante (Colla et al., 2004; Deshniem et al., 2000; Olguín et al., 2001). Ácido palmítico é um ácido graxo importante para alimentação infantil, encontrado de 20 a 30 % no leite materno. No entanto, em adultos, ácidos graxos saturados têm sido associados com o aumento do risco de doenças cardiovasculares (Willis et al., 1998). Já os demais ácidos graxos saturados (AGS) variaram entre 0,28 e 5,32 %. Os AGS são importantes na produção de biodiesel, com alto número de cetano e são menos propensos à oxidação que os compostos insaturados (Canakci, 2007). A oxidação causa polimerização e formação de goma, evitando a combustão completa (Ma & Hanna, 1999).

De todos ácidos graxos monoinsaturados (AGM), o ácido trans-9-octadecenoico (ácido oléico) (C18:1) foi observado em todos os ensaios, sendo a máxima concentração obtida 4,93 % no ensaio E3 (20 % EPB com adição de 5,28 g.L⁻¹ de NaHCO₃). O ácido palmitoléico (C16:1) apresentou a maior concentração em relação aos outros AGM, variando de 7,73 a 9,80 %. O ácido palmitoléico é responsável pelo metabolismo dos lipídios, podendo ajudar no equilíbrio dos níveis de colesterol HDL e LDL, reduzir a taxa de açúcar no sangue e favorecer a diminuição de gordura dos tecidos que envolvem o fígado e o coração (Wen & Chen, 2003). Os resultados apresentados estão semelhantes aos encontrados por Morais & Costa (2008) que obtiveram 10,60 % de ácido palmitoléico (C16:1) para a microalga *Spirulina* sp. quando cultivada com meio Zarrouk padrão com adição de 6 % de dióxido de carbono.

A adição de NaHCO₃ no cultivo da microalga *Spirulina* levou ao incremento na concentração de PUFAs à medida que aumentou a concentração de bicarbonato de sódio. As maiores concentrações de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) encontradas na biomassa foram de ácido linoléico (12,94 e 14,24 %), quando a microalga *Spirulina* LEB-18 foi cultivada com 20 % de EPB e adição de 2,8 g.L⁻¹ e 5,28 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio, respectivamente. Quando a microalga foi cultivada com meio Zarrouk padrão, obteve-se

11,97 % de ácido graxo alfa-linolênico (C 18:3n3). Resultados semelhantes foram encontrados por Gouveia & Oliveira (2009), que cultivaram a microalga *Spirulina máxima* com meio padrão e obtiveram 17,89 % do ácido graxo linoléico e 18,32 % de alfa-linolênico.

Os PUFAs podem atuar na prevenção e tratamento de muitas doenças cardiovasculares, redução da pressão arterial, redução dos níveis de colesterol e triacilglicerídios no plasma, contra o câncer, e, além disso, são considerados essenciais tanto para nutrição infantil quanto para o desenvolvimento cerebral (Simopoulos, 2002). A biomassa microalgal comparada com outras fontes de ácidos graxos, como diversas espécies de peixes (bacalhau, anchova e sardinha), apresenta algumas vantagens como ausência de contaminação com metais pesados e ainda certas microalgas possuem maior diversidade de PUFAs, alguns com cadeias com mais de 18 átomos de carbono (Wen & Chen, 2003). Em humanos, os ácidos linoléico e alfa-linolênico são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. (Martin et al., 2006).

3 CONCLUSÃO

O maior conteúdo lipídico para a *Spirulina* LEB-18 foi 5,0 % quando cultivada em meio Zarrouk padrão e em 20 % EPB com adição de 5,28 g.L⁻¹ de NaHCO₃. O perfil de ácidos graxos obtido, mostrou ser o ácido palmítico (C16:0) o mais abundante, alcançando 38,48 % quando a microalga foi cultivada com 20 % EPB e adição de 5,28 g.L⁻¹ de NaHCO₃. A maior quantidade em ácidos graxos essenciais encontrada na biomassa microalgal foi 14,24 % de ácido linoléico e 11,97 % de ácido linolênico.

Os resultados mostraram que, dependendo das condições de cultivo e dos nutrientes adicionados no meio, pode-se incrementar a biossíntese de ácidos graxos saturados ou insaturados, de acordo com a utilização que se pretende dar à biomassa formada. O cultivo de *Spirulina* LEB-18 com adição de EPB apresentou biomassa rica em ácidos graxos, importantes na alimentação e na produção de biocombustíveis. Assim, aliar o cultivo de microalgas com EPB, torna-se um atrativo, podendo ser obtido um componente de alto valor agregado, como os ácidos graxos.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, S. C. & GARCIA, V. M. T. Growth biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. *Aquaculture*, v. 246, p. 405 – 412, 2005.
- BANERJEE, A.; SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit Rev Biotechnol.*; v.22, p.245–79, 2002.
- CANAKCI, M. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. *Bioresource Technology*, Essex, v. 98, p. 183-190, 2007.
- COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zeitschrift fur Naturforschung*, Tübingen, v. 59c, p. 55-59, 2004.
- DESHNIUM, P.; PAITHOONRANGSARID, K.; SUPHATRAKUL, A.; MEESAPYODSUK, D.; TANTICHAROEN, M.; CHEEVADHANARAK, S. Temperature-independent and dependent expression of desaturase genes in filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC 9438). *FEMS Microbiology Letters*, Birmingham, v. 184, p. 207-213, 2000.
- FERNANDÈZ, F. G. A., PÉREZ, J. A., SEVILLA, J. M. F., CAMACHO, F. G., GRIMA, M. E. Modeling of eicosapentaenoic acid (EPA) production from *Phaeodactylum tricornutum* cultures in tubular photobioreactors: Effect of dilution, tube diameter, and solar irradiance. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 68, p. 173 – 183, 2000.
- FOLCH, J. & LEES, M. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 226, p. 497-509, 1957.
- GOUVEIA, L. & OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 36, p. 269-274, 2009.
- GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res.*, v. 45, p. 160–86, 2006.
- LEHNINGER, A. L. *Bioquímica: Componentes moleculares das células*. São Paulo. SP. Editora Edgard Blucher LTDA. ISBN 8521200285, 2004.
- MA, F.; HANNA, A. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, Essex, v. 70, p. 1-15, 1999.
- MACEDO, R. V. T. & ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em dois níveis de temperatura – Parte II: Produção de lipídios. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.*, v. 21, p. 1 – 9, 2001.

- MARTIN, C. A., ALMEIDA, V. V., RUIZ, M. R., VISENTAINER, J. E. L., MATSHUSHITA, M., SOUZA, N. E., VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 6, p. 761-770, 2006.
- METCALFE, L. D. A. A.; SCHIMITZ, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, North Carolina, v. 38, p. 510, 1966.
- METZGER, P.; LARGEAU, C. Botryococcus braunii: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 66, p. 486-96, 2005.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, p. 1245-1251, 2008.
- OLGUÍN, E. J. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances*, v. 22, p. 81-91, 2003.
- OLGUÍN, E.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (Arthospira) grown on digested pig waste. *Bioresource Technology*, Essex, v. 77, p. 19-24, 2001.
- RADMANN, E. M. & COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. *Quím. Nova*, v. 31, p. 1609-1612, 2008.
- SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacoth.*, v. 56, p. 365-379, 2002.
- WEN, Z. Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, Waterloo, v. 21, p. 273-294, 2003.
- WILLIS, W. M.; LENCKI, R. E.; MARANGONI, A. G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. *Criticals Reviews in Food Science and Nutrition*, Cleveland, v. 38, p. 639-674, 1998.
- ZARROUK, C. Contribution a l'étude d'une cyanophycee: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler. Thesis (Ph.D.) - University of Paris, Paris, 1966.